

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-032026

(43)Date of publication of application : 01.02.1990

(51)Int.Cl. A61K 35/84
// A61K 37/02

(21)Application number : 63-180689

(71)Applicant : MEIJI MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 20.07.1988

(72)Inventor : MIZUMOTO KENJI
YAMASHITA AKIO
KII MITSUSUKE
SUMIO HAJIME

(54) ANTIRETROVIRUS AGENT**(57)Abstract:**

PURPOSE: To obtain an antiretrovirus agent, containing a substance LZ-8, derived from mycelia of the genus Ganoderma and having immunosuppressive activity and specific physico-chemical properties without agglutinating human erythrocytes as an active ingredient and useful for inhibiting propagation of cells infected with human retroviruses, etc.

CONSTITUTION: A substance LZ-8 (e.g., FERM P-1826), derived from mycelia of the genus Ganoderma and having physico-chemical properties of (a) 16000-18000 molecular weight measured by a sodium dodecyl sulfate(SDS) gel electrophoretic method and 12000-16000 measured by a Tricine SDS gel electrophoretic method, (b) 0.3-1.8% sugar content based on protein content and (c) mannose, galactose and hexosamine as constituent sugars with immunosuppressive activity without agglutinating human erythrocytes as an active ingredient. The above-mentioned active ingredient can be utilized for treating human immunodeficiency virus(HIV) and human T-leukemia virus-I (HTLV-I) (AIDS virus and adult T cell leukemia virus).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Best Available Copy

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑤ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑥ 公開特許公報(A)

平2-32026

⑦ Int. Cl.³
A 61 K 35/84
// A 61 K 37/02

識別記号

ADY A

庁内整理番号

8413-4C
8815-4C

⑧ 公開 平成2年(1990)2月1日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全15頁)

⑨ 発明の名称 抗レトロウイルス剤

⑪ 特 願 昭63-180689

⑫ 出 願 昭63(1988)7月20日

⑬ 発 明 者 水 本 憲 司 神奈川県小田原市成田540 明治乳業ヘルスサイエンス研
究所内

⑭ 発 明 者 山 下 明 男 神奈川県小田原市成田540 明治乳業ヘルスサイエンス研
究所内

⑮ 発 明 者 紀 光 助 神奈川県小田原市成田540 明治乳業ヘルスサイエンス研
究所内

⑯ 発 明 者 角 尾 肇 神奈川県小田原市成田540 明治乳業ヘルスサイエンス研
究所内

⑰ 出 願 人 明治乳業株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番6号

⑱ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

抗レトロウイルス剤

2. 特許請求の範囲

1. マンネンタケ属 (*Ganoderma*) の菌糸体由来で、ヒト赤血球を凝集せず、免疫抑制能を有し、以下の理化学的性質をもつ物質 LZ-E を有効成分とする抗レトロウイルス剤。

(1) 分子量は SDS ゲル電気泳動法では 16000 ~ 18000、トリシン SDS ゲル電気泳動法では 12000 ~ 14000 を示す。

(2) 糖含量は蛋白質含量に対して 0.8 ~ 1.8 %。

(3) 構成糖としてマンノース、ガラクトース及びヘキソサミンが含まれている。

2. 請求項1の抗レトロウイルス剤において、

レトロウイルスが HIV (human immunodeficiency virus) である抗レトロウイルス剤。

3. 請求項1の抗レトロウイルス剤において、

レトロウイルスが HTLV-1 (human T-leukemia virus 1) である抗レトロウイルス剤。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はレトロウイルス、特に HIV (human immunodeficiency virus) および HTLV-1 (human T-leukemia virus 1) に対する新規な抗レトロウイルス剤に関する。更に詳しくは、マンネンタケ属 (*Ganoderma*) の菌糸体から抽出された新規物質 LZ-E を有効成分とする抗レトロウイルス剤に関する。

(従来の技術)

レトロウイルスは遺伝子としてRNAを持つ球状のウイルスであり、ヒトに感染するレトロウイルスとしては、AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) の病原ウイルスであるHIVとATL (adult T-cell leukemia; 成人T細胞白血病) の病原ウイルスであるHTLV-1の2つが知られている。そして現在までのところAIDS、ATLのいずれにも有効な治療法がなく、発病後数年以内に患者は殆ど全てが死亡するに至っている。

そこでこれらのレトロウイルスに感染した患者の治療に有効な抗レトロウイルス剤を求めて、世界各国で精力的な研究がなされている。

その特許権(特開昭63-107926号、特開昭63-107938号)がある。

更にAZTの併用療法として、AZTとアシタロビル (acyclovir)、インターロイキン-2、或はライポビリン (ribovirin) との組合せが研究されている。

また、発病していないキャリアー(保菌者)に対して発病防止のために、レンチナン、β-インターフェロン、グリチルリチン等、各種の免疫賦活剤の投与が試みられている。

一方、抗HTLV-1剤として有効な薬剤は未だに発見されていないのが現状であり、僅かにDDP (2'-deoxy-2'-fluorodeoxyribose) が有効であることが示されているのみである (Yamaguchi, K. et al.; (1986) Leukemia Res., 10,

特開平2-32026(2)

しかしながら、これまでに上市されている抗HIV剤としてはアジドチミジン (3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine; 以下AZTという) が存在するのみであるが、(Milouse, H. et al.; (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7098-7100)、AZTは副作用として著明な骨髄抑制作用があり、長期の投与には問題があると考えられている (Rohmann, D. D. et al.; (1987) New Eng. J. Med., 317, 186-191)。

また現在臨床試験中の抗レトロウイルス剤としては、ジデオキシリボチジン (2', 3'-dideoxyribose; 略称DDC) があり、またAZT及びDDCと構造が類似するものとしては、ピリミジンヌクレオシドやプリンヌクレオシ

989)。

(発明が解決しようとする課題)

このような状況下でこれらのレトロウイルスの増殖を阻止し、しかも副作用が少ない新規な薬剤が強く求められている。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは先にマンネンタケ属 (*Ganoderma*) の菌糸体から得られる、以下の理化学的性質、

- (1) 分子量はSDSゲル電気泳動法では12000~14000、トリシンゲルSDS電気泳動法では12000~16000を示す。
- (2) 糖含量は蛋白質含量に対して0.3~1.0%。
- (3) 糖成分としてマンノース、ガラクトース及びヘキソサミンが含まれている。

特開平2-32026(3)

をもつ新規物質 LZ-8 が優れた免疫抑制能を有することを見い出し、先に特許出願した（特願昭 62-106025 号及び特願昭 63-105678 号）。

更に、本発明者らは該物質 LZ-8 についてその生理活性を調べていたところ、これが意外にもヒトレトロウイルス HIV や HTLV-1 の感染細胞の増殖の抑制効果及びウイルスの産生抑制効果を有することを見い出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は上記の理化学的性質を有する物質 LZ-8 を有効成分とする抗レトロウイルス剤を提供するものである。

本発明の物質 LZ-8 は、例えば、マンネンタケ菌の菌糸体から次のようにして製造され

る。

A 使用されるマンネンタケ菌糸体

本発明者らの研究によれば、本物質はマンネンタケの菌糸体に存在し、その子実体には見出されていない。

本物質の製造に使用されるマンネンタケ菌糸体としては、原色日本菌類図鑑（保育社版）並びに伊藤誠也著、日本菌類誌（養賢堂版）に準じて同定された菌糸体であれば、天然のものでもまた人工培養したものでも使用することができる。しかし、菌株によつて産生量にバラツキがあつたり、又採取した菌株の地域差が存在する可能性があるため、本物質を効率的に得るには LZ-8 産生量の多い特定の菌株、例えば農工研に寄託されている農工研

発第 1826 号（FERM BP-1826）等の使用が適当である。

B 菌糸体の培養

マンネンタケ菌糸体は、工業的には人工培養したものを使用するのが好ましく、この人工培養には、静置培養、揺盪培養又は浮遊液培養のいずれの方法も用いることができる。以下に人工培養の方法の概略を記す。

マンネンタケ菌糸体はまず斜面培養を行ない、次いでこの斜面培養から適当な菌体量を液体培養に接種し前培養を行なう。液体培養中の菌体の増殖が定常期に達した時点で前培養を終了させ、プラスチックプレート等を用いた静置培養、フラスコ等を用いた揺盪培養若しくはシャーフアメンター等を用いた浮遊

液培養による本培養を行なう。

培養は次のような条件で行われる。培地としては通常真菌類の培養に用いられる培地が使用できる。その中でもポテト-デキストロース培地が好ましく、培地濃度は 2～3%（v/v）が適当である。ポテト-デキストロース培地は、市販のものでも又ポテト抽出液にグルコース等の単糖を加えた自家調整培地でも使用できる。培養温度は 25～30℃、溶存酸素量は酸素移動係数（ K_L ）で 0.36～0.65 $\text{mM O}_2 / \text{min} \cdot \text{ml}$ の範囲が適当である。又培地の pH は 5.5～5.8 の間が望ましい。通常接種量は約 5～10 時間乾燥菌体 / 100 ml で十分であり、7～20 日程度の培養が好ましい。

特開平2-32026(4)

静置培養は、上述の培養条件で行えば特に問題なく培養を行なうことができる。また振盪培養の場合には、酸素移動係数が上述の範囲になる様に培養器の振盪の振幅数を設定する必要がある。更に浮遊攪拌培養の場合には上述の酸素移動係数条件が達成されるように、使用する振盪の物理的制御（攪拌速度、通気量等）を行なう。その制御値は培養器によつて異なるが、例えば容量14Lのジャーフアメンター（NBB社製）の場合、10Lの培養地を入れた時は、攪拌速度200 r.p.m.、強制通気量2～3 L air/min程度が適当である。

以上の培養方法を適宜選択して用いることにより、高収率で目的とするマンネンタケ菌

菌としては塩酸、硫酸、或は酢酸等が、また塩基としてはアンモニア水、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、或は水酸化カルシウム等が使用できるが、通常は塩酸水溶液、又は塩酸緩衝液を使用するのが好ましい。培養のpHは約5～6の微酸性乃至微塩基性が好ましい。

抽出時の水性溶媒の温度は本物質を取得する上で極めて重要な要素であり、0℃以下の温度で行なうことが適切である。抽出温度を100℃近辺に設定して行なうことも可能ではあるが、抽出されたLE-8が活性等を損として生理活性を減ずるために収率面から見ると好ましくない。

D 単離精製の方法

糸体を得ることができる。

C 抽出の方法

本物質LE-8は菌糸体中に生産されるので、菌糸体を集菌し、これからLE-8を水性溶媒を用いて抽出を行う。

抽出の際には菌糸体を粉砕しておかなくても、処理量が少量であれば抽出可能であるが、収率を考慮すると菌糸体を予め粉砕し、抽出することが好ましい。なお、菌糸体は集菌後に凍結乾燥等の乾燥処理を行なつて保存しておき、適宜LE-8の抽出・精製に用いても良い。

抽出溶媒としては、水性溶媒、例えば水、又は水可溶性酸・塩基等を少量含有する水溶液、若しくは緩衝液が適当である。これらの

LE-8を含有する抽出液から遠心分離、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を適宜組み合わせることによりLE-8を単離精製できる。

精製の手順は概略以下の通りである。なお精製はその全過程において4～10℃の低温で行なう。

まず抽出液を遠心分離にかけて不溶物を除去し、次いで平衡化したセファデックスQ-75にかけてゲル濾過による分離を行ない、更に活性成分を平衡化したDEAEセファデックスA-25に吸着させる。そしてゲル平衡化用緩衝液を含む濃度0.1M程度の塩化ナトリウム溶液（pH 8.0）で溶出させる。活性成分を

JP, 02-032026, A

STANDARD ZOOM-UP ROTATION No Rotation REVERSAL RELOAD

PREVIOUS PAGE

NEXT PAGE

特開平2-32026(5)

集めて透析し、透析後の溶液を凍結乾燥してこれを精製品とする。

この他に L2-8 のモノクローナル抗体が固定化されたアフィニティークロマトグラフィーを利用することによつて高収率で本物質を得ることができる。

なお L2-8 精製品は凍結乾燥状態で -80℃ で保存すると少なくとも 1 年間は活性維持が可能である。

本発明に係る抗レトロウイルス剤の有効成分 L2-8 の患者への投与量は、症状の軽重や患者の年齢、性別、L2-8 に対する感受性などにより異なるが、通常成人 1 日当たり 10 ㎍～100 ㎍であり、これを 1 回或いは何回かに分けて投与する。本発明の抗レトロウイルス

薬剤は手術で用いてもよく、他の抗レトロウイルス剤と併用して投与してもよい。

投与方法は経口投与、静脈注射、皮下注射、筋肉内注射など任意の方法を取ることが出来る。

製剤化に際しては周知慣用の方法により製剤用の担体や補助剤を用いて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、注射剤などを調製すればよい。すなわち固形剤の場合は、乳糖、蔗糖、デキストリン、磷酸カルシウム、ソルビトなどの賦形剤、アラビアゴム、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、トラガントなどの結合剤、澱粉などの崩壊剤等が使用され、必要に応じて保存剤、安定化剤等を混合する。液剤の場合は、補助剤として

シロップ、メチルセルロース、ゼラチン、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲル等を適宜有効成分に添加して製剤化されるが、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、ソルビン酸などの防腐剤を併せて用いることもできる。また注射剤の場合には、必要に応じて有効成分と pH 緩衝剤、可溶性化剤、防腐剤、安定化剤等を混合して調製する。

〔実施例〕

次に L2-8 を製造するための参考例及び本発明の実施例を挙げて説明する。

参考例 (L2-8 の製造)

ポテト-デキストロース-寒天培地 (0.24%)、ポテト-デキストロース-ブローンス培地 (DIFCO 社)、0.1% 寒天、水 100 ㎖) を

121℃、20 分間滅菌処理し、pH 5.7 に調整し、マンネンタケ菌系体 (Genodermaleclidium H16、微工研発第 1826 号) を接種し、試験管にてスラント培養を行った。28℃で 7 日間培養した後、得られたマンネンタケ菌系体を 500 ㎖三角フラスコの 2.4% (w/v) のポテト-デキストロース-ブローンス培地 (DIFCO 社) 200 ㎖、pH 5.7 に 1 白金耳接種し、レシプロシエーカー (B.B.H. 社) で 110 サイクル・30 mm ストローク / 分で振とう培養を 28℃で 14 日間行い、前培養とした。培養終了後、菌系体を含む培養液 2 ㎖を 10 本の 500 ㎖三角フラスコの 2.4% (w/v) のポテト-デキストロース-ブローンス培地、200 ㎖、pH 5.7 に各 4 接

特開平2-32026(公)

後、レンジプロシエーカーで110サイクル・10mmストローク/分で再試験とう培養を2日、14日間行つた。

培養終了後、菌糸体を含む全培養液を遠心分離(13000×g、10分、Kontes社H401)にかけ菌糸体を集菌した。菌糸体重量は、全量で33.7gであつた。

純菌した菌糸体約200gを室温の10mM Tris-HCl緩衝液(Bioass社)pH8.0、300mlに対して拡散させ、ポリトロン(Klimatica社CH-8010KBIENS-LV)にて菌糸体を粉砕し、遠心分離(86000×g、20min)にかけ上清約240mlを抽出液とした。

この抽出液を10mM Tris-HCl緩衝液pH

(Labconco社、スペースセーバデフラクサス75035)にて凍結乾燥し、51mgの精製LE-8を得た。

崩くして得られたLE-8は次の物性を有する。

① 分子量

SDSゲル電気泳動法で16000~18000の分子量で、トリシンSDS電気泳動法で12000~14000の分子量を示す。

すなわち、精製した本物質を15%アクリルアミドを含むSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によつて分離し、分子量を測定すると、第1図(2)に示す通り12500付近にバンドを示す。

還元した精製本物質を同様にSDSポリア

8.0で平衡化した(本のセファデックスG-75カラム(Pharmacia社K50/100)によるゲル濾過にかけ、活性画分約2.4を回収した。次にこの活性画分を10mM Tris-HCl緩衝液pH8.0で平衡化したDEAEセファデックス-25(Pharmacia社K25/40)にかけ、吸着させ0.1M NaCl(和光純薬)を含む10mM Tris-HCl緩衝液pH8.0にて洗出させ活性画分約400mlをブールした。

ブールした活性画分を分子量2500カトオフ透析膜(SPECTRA POR, membrane tubing)に入れ、2mM (NH₄)₂CO₃溶液にて48時間透析を行つた。尚抽出から透析までは、全て4℃の低温で行つた。

透析終了後、透析内液を凍結乾燥機

リルアイドゲル電気泳動にかけると12100付近にバンドを示す(第1図(3))。

又還元した本物質を最近開発されたトリシン(Trisil; N-tris(hydroxymethyl)methyl-glycine)-SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(H. Schägger and O. Jagow, Anal. Biochem. 116, 368-379 (1987))にかけると12800~14400付近にバンドを示す(第2図)。

② 等電点

等電点は、pH4.4~4.6を示す。

精製した本物質を等電点電気泳動にかけると本物質の等電点は第3図に示す通りpH4.4の付近にバンドを示す。

③ 物質の形状

特開平2-32026(7)

凍結乾燥品は白色である。

④ 構造的特徴及び呈色反応

本物質は略類が付加されている。精製した本物質をネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ過ヨウ素酸－シッフ（PAS 染色）染色にかけると第4図に示す通り、染色され結の存在を示す。

またアノスロン法（化学の領域、編越、増刊24号、56（1958））による糖含量は本物質蛋白質量に対して2.3～4.8重量%であり、本物質加水分解後、得られた遊離単糖について高速液体クロマトグラフィーにより分析すると構成糖としては、ガラクトース、マンノース、ヘキソサミン、そして微量もしくはトレースとしてフコース等が検出され

とペプチド結合の特性吸収である $210 \text{ m}\mu$ 及び芳香族アミノ酸の特性吸収である $270 \text{ m}\mu$ に吸収を示す。

① 線外線取

本物質の赤外線吸収は、第 6 図で示される。

1400 cm^{-1} のブロードな吸収は、主として糖鎖アルコールの νOH であり、蛋白質鎖中のペプチド結合由来の吸収として 1640 cm^{-1} に $\nu\text{C}=\text{O}$ のアミド I、 1540 cm^{-1} に δNH_2 のアミド II を示す。 νNH_2 の吸収は、 3400 cm^{-1} のブロードな吸収と重なっており区別されない。又、 1450 cm^{-1} にある小さな吸収及び 1400 cm^{-1} にあるシャープな吸収は、 δNH 又は δOH と思われる。その他 δNH 及び νCN の吸収である 1250 cm^{-1} と $\nu\text{C}-\text{O}$ の吸

る、尚、かかる分析法によればフルコースも検出されるが、培養成分あるいは精製時使用の担体等から容易に混入する可能性があるため構成種であるか否かははつきりしない。

⑤ 溶解性

水に可溶でエタノールに不溶。

⑥ 紫外部及不可視部吸収

本物質の紫外部及び可視部吸収を測定すると第5図に示す通り、240 mμと276 mμに吸収を示す。可視部には吸収は認められない。

具体的には、PBS緩衝液に溶解した本物質をPBS緩衝液で450nm~850nmの範囲をビロ補正した分光光度計（KONTONUVIRON #40）で紫外部及び可視部吸収を測定する。

取である 1.0×10^{-1} にそれぞれ吸収を示す。

⑧ NMR 吸收

本物質の400 MHz.でのプロトン NMR 吸収スペクトルは第7図に示される。

メチル基の特性吸収である $1.0 \sim 1.5$ ppm の範囲にシャープな吸収を示し、又 $3 \sim 5$ ppm 及び $0.8 \sim 2.5$ ppm の範囲に蛋白質の各結合水素のプロードな吸収を示す。 $3 \sim 5$ ppm 間のプロードな吸収はアミノ酸の α 、 β -結合の水素の吸収と糖鎖の結合 $2, 3, 4, 5, 6$ 位に結合した水素の吸収が重なったもので、 $0.8 \sim 2.5$ ppm のプロードな吸収は脂肪酸アミノ酸（例えばバリン、ロイシン）の α 、 β -結合以外の水素の吸収及びメチル基の吸収が重なった吸収である。

特開平2-32026(8)

尚、第7圖の27 ppm 付近のシヤープを吸収は、本物質の精製時に使用した緩衝液由来のものの吸収範囲であり特性吸収ではない。又43 ppm 付近のシヤープを吸収は、NMR測定時に使用する溶媒由来のもので本物質の特性吸収ではない。

⑤ 丁字ノ體組成

本物質の丁ニノ酸分析をした結果を表1に示す。

尚、アミノ酸表示は、日本生化学会編、生化学データブック 1970 の表示法にした。

又モル%表示は、分析の結果、検出された各アミノ酸のモル数の合計に対しての各アミノ酸のモル数の比率として示した。またモル%の値は、23(2回測定)、24、46時間

加水分解した時の値の最小値と最大値で示した。加水分解中徐々に破壊されるスレオニンとセリンは、22, 24, 48時間加水分解した時の値をアラニンを基準として、まず比較し、得られたスレオニンとセリンの相対値をプロットし、得られたグラフより最小自乗法を用いて0時間加水分解の値をセル数とした。システインは、過マンガン酸法により処理し測定した。トリプトファンは分光学的方法により測定した。

以下余自

張

| アミノ酸 | モル% | アミノ酸 | モル% |
|--------------|-----------|------|---------|
| AsX(Asp+Asn) | 15.0~20.0 | Leu | 5.0~5.6 |
| Phe | 7.0~9.0 | Leu | 5.0~9.0 |
| Ser | 2.0~2.0 | Tyr | 1.5~2.0 |
| GLX(Glu+Gln) | 5.0~7.5 | Phe | 5.0~6.5 |
| Gly | 7.0~9.0 | Lys | 2.0~3.0 |
| Ala | 6.0~8.5 | His | 0.0~0.1 |
| (1/2)Cys | 0.0~1.0 | Trp | 1.0~2.2 |
| Val | 8.5~10.4 | Arg | 2.0~4.0 |
| Met | 0.0~0.2 | Pro | 4.0~6.0 |

④ アミノ酸配列

本物質はその蛋白構造部分に以下に示す2つのアミノ酸配列が少なくとも1つ以上含まれる。

ベプテフ : -(Loh-Aia-Teg-Aep-Vol-Ly's)-

④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ : -(Asp-Leu-Gly-Val-Lys-Pro-
Ser-Tyr-Ala-Val)-

アミノ酸表示方法は日本生化学会編、生化学データブック 1980 の表示方法に準じて行つた。

次に本発明の実施例を示すが、以下の実施例においては、レトロウイルス HIV と HTLV-1 はヒト及びチンパンジーにしか感染しないので、抗レトロウイルス剤としての効果を示すための実験は *in vivo* の系では困難であるため、培養細胞を用いた *in vitro* の系で行った。

以下に実施例で使用した細胞系、アッセイ方法、試験等について記す。

実施例 1 ～ 3 で用いた細胞株はヒト急性白血病

特開平2-32026(9)

血癌細胞株 Molt - 4 (ATCC CBL 1582) の HIV 持続感染細胞株 Molt - 4 / HIV (Yamamoto, Maeki : (1986) J. Virol. 57, 1159 - 1182) 及び HIV に対して感受性の高い細胞株 Molt - 4, clone No 8 である。なお Molt - 4 / HIV, Molt - 4, clone No 8 とともに山口大学医学部の山本直樹博士より分与されたものである。また、Molt - 4 / HIV は増殖しつつ HIV を産生してこれを培養上清に放出する。

実施例 4 で用いた細胞株も全てヒト白血病由来の細胞であり、そのうち TAK (Tejima et al. : (1984) Gene, 75, 99 - 102), MT - 1 (Miyoshi, I. et al. : (1980) Gene, 71, 155 - 156), MT - 2 (Miyoshi, I. et al. : (1981) Nature, 294, 770 - 771),

及び MT - 4 (Miyoshi, I. et al. : (1982) Gene, 73, 219 - 228) は HTLV - I に感染している細胞株である。一方、H3 (Gallo, R. C. et al. : (1984) Science, 224, 697 - 500) 及び TALL - 1 (Miyoshi, I. et al. : (1977) Nature, 267, 843 - 844) は HTLV - I 非感染の細胞株である。実施例 4 で用いられた細胞株は全て東京大学医学研究所の辻本元博士から分与されたものである。

培養液の組成は RPMI 1640 にウシ胎児血清を 10% (v / v) 添加したものである (以下では培養液のことを「培地」ともいう) 。但し、TAK のみは RPMI 1640 にウシ胎児血清を 20% (v / v) を添加し、IL - 2 存在下で培養した。

各細胞の培養条件は通常の細胞培養条件 (気相が空気 : CO₂ = 95 : 5、温度 37℃) である。

細胞の増殖の測定は「免疫実験操作法 XI」 (日本免疫学会編)、pp. 4477 - 4482 に記載の方法に従って MTT (3 - (4, 5 - dimethylthiazol - 2 - yl) - 2, 5 - diphenyl tetrazolium bromide) アッセイによって測定した。なおこのアッセイで使用する試薬のうち、MTT は、同仁化学研究所製で PBS に溶解して 5 mg / ml としたものを 0.2 ml のメンブランフィルターで濾過滅菌して使用し、塩酸 - イソプロパノール液はイソプロパノールに塩酸を 0.04 N になるように添加して作成したものを用いた。そして測定に際

しては、マイクロプレート内の各ウェルに 20 μ l の MTT 溶液を添加し、MTT 溶液が培養液に均一に混和するようによく振盪攪拌して 6 時間培養を続けた。反応終了後反応液を 120 μ l 捨て、塩酸 - イソプロパノール液を 180 μ l 加え、ウェル中の黒い結晶が完全に溶解するまで振盪攪拌した。直ちに (1 時間以内) マイクロプレートリーダー (東ソー社製のモデル MPR - 44) を用いて主波長 492 nm、副波長 600 nm で比色定量を行なった。

実施例 1 (HIV 感染細胞株に対する増殖抑制効果)

Molt - 4 / HIV を培養している培地に本発明に係る IL - 8 を添加することによる増殖抑制効果を調べた。

特開平2-32026 (10)

Molt-4 HIV 細胞を 3×10^4 個 / $200 \mu\text{L}$ 培養液 / well の割合で 96 穴マイクロプレートにまき、LS-8 の PBS (精製経菌培養液) 溶液を最終濃度で $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 及び $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ とするように加え、該細胞を培養してその増殖を培養 2 日目から 5 日目まで測定した。なお、対象として LS-8 を添加していない PBS を培養に加えた系を用いた。

測定結果は第 8 図に示す。図中、□-□ は PBS を添加したもの、▼-▼ は LS-8 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加、○-○ は LS-8 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加を表わす。この図に示されるように、LS-8 は測定を行なった 2 日目から 5 日目に亘つて Molt-4/HIV の増殖を部分的に抑制した。対照と比較して抑制した割合は LS-8 が 10

例 1 と同じ条件で 3 日間培養した後、培養上清を採取した。この培養上清を一部はそのまま保ち、残りは培養液で 2^1 、 2^2 、 2^3 、 2^4 、 2^5 、 2^6 、 2^7 、 2^8 及び 2^9 倍に希釈した。

一方 Molt-4, clone Nb 8 を 3×10^4 個 / $150 \mu\text{L}$ 培養液 / well の割合で 96 穴マイクロプレートにまいておいた。そしてこの培養液に上記の培養上清原液および $2^1 \sim 2^9$ の各希釈度の培養上清を $50 \mu\text{L}$ ずつ添加して培養を開始した。培養開始後 4 日目に実施例 1 記載の方法と同様な MTT アッセイを行なつて Molt-4, clone Nb 8 の生細胞数を測定した。

結果は第 9 図に示す。図中、□-□ は PBS を添加したもの、▲-▲ は LS-8 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 添加を表わす。この図から LS-8 を添加

$\mu\text{g} / \text{mL}$ 及び $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度の時、それぞれ $76 \sim 82\%$ 及び $60 \sim 67\%$ であった。

なお、LS-8 は本実施例における最高濃度 ($30 \mu\text{g} / \text{mL}$) では HIV 非感染 Molt-4 細胞に対して全く毒性を示さなかつた。

実施例 2 (HIV 感染細胞の HIV 産生を抑制する効果)

Molt-4/HIV は増殖しつつ HIV を産生してこれを培養上清に放出する。LS-8 がこの HIV 産生を抑制することを示す実験を行なつた。

細胞を 4×10^4 個 / $200 \mu\text{L}$ 培養液 / well の割合で 96 穴マイクロプレートにまき、LS-8 の PBS 溶液を最終濃度で $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 加えて (対照は LS-8 無添加の PBS)、実施

した Molt-4/HIV の培養上清は対照の培養上清と比較して、原液から 2^6 希釈液まで Molt-4, clone Nb 8 の生細胞数が多かつたことが判る。即ち培養上清中に放出された HIV の量が減少したことが示されているのである。

実施例 3 (HIV 感染細胞と HIV 非感染細胞との混合培養による巨細胞形成に対する抑制効果)

細胞株 Molt-4/HIV と Molt-4, clone Nb 8 とを混合培養すると急速に多核巨細胞が出現し、やがて該巨細胞は死滅することが知られている (Sodroski, J. et al. (1986) Nature, 322, 470-474)。LS-8 がこの現象を抑制する効果があることを示す実験を

JP, 02-032026, A

STANDARD ZOOM-UP ROTATION No Rotation REVERSAL RELOAD

PREVIOUS PAGE

NEXT PAGE

特開平2-32026(11)

行なつた。

LE-8 処置群には最終濃度 20 μ g/ml の LE-8 を培地に添加し、一方対照群には何も添加せずに、 5×10^3 個の Mo1s-4/HIV と 3.5×10^4 個の Mo1s-4 clone No 8 とを 200 μ l の培地で 3 日間混合培養した。そして培養終了後に顕微鏡により巨細胞の出現を観察した。代表的な結果を第 10 図 (LE-8 処置群) 及び第 11 図 (対照群) に示す。第 10 図では数個の小さな多核細胞が出現しているのに対して、第 11 図では大きな多核巨細胞が多数出現している。

この結果から、LE-8 が多核巨細胞形成現象を抑制する効果があることが示された。

実施例 4 (HTLV-1 感染細胞に対する増殖抑

制効果)

HTLV-1 に感染している細胞株 TAK、MT-1、MT-2、及び MT-4、HTLV-1 非感染の細胞株である H9 及び TALL-1 をそれぞれ 2×10^4 個/200 μ l 培養液/well ずつマイクロプレートにまいた。そして LE-8 処置群には LE-8 を最終濃度 9 μ g/ml となるように添加し、対照群には PBS のみを添加した。4 日間培養後、MTT アッセイにより生細胞数の数を測定した。

その結果を対照群に対する LE-8 処置群の百分率で表 2 に示す。

以下余白

表 2

| 細胞株 | HTLV-1 感染 | % 対照群 |
|--------|-----------|-------|
| H9 | - | 91 |
| TALL-1 | - | 90 |
| TAK | + | 54 |
| MT-1 | + | 73 |
| MT-2 | + | 64 |
| MT-4 | + | 43 |

表 2 が示すように、HTLV-1 非感染細胞である H9 及び TALL-1 では LE-8 処置群の生細胞数は対照群の 90% 以上であつたのに対して、HTLV-1 に感染している細胞株 TAK、MT-1、MT-2 及び MT-4 では LE-8 処置群の生細胞数は対照群の 43 ~ 73% であつた。これは LE-8 が HTLV-1 感染細胞の増殖を選

択的に抑制することを示すものである。

(発明の効果)

以上の実施例 1 ~ 4 から明らかなように本発明に係る抗レトロウイルス剤の有効成分

LE-8 は、HIV については、

(1) HIV 感染細胞株 Mo1s-4/HIV に対する増殖抑制効果、

(2) Mo1s-4/HIV の HIV 産生を抑制する効果、

(3) HIV 感染細胞と HIV 非感染細胞との混合培養による巨細胞形成の抑制効果、を持つことが示され、また HTLV-1 については、HTLV-1 感染細胞の増殖を抑制することが示された。

これらの結果から本発明の有効成分である

特開平2-32026 (12)

LZ-8 はレトロウイルス HIV 及び HTLV-1 の治療に利用できることが期待される。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、LZ-8 の SDS ポリアクリルアミド電気泳動による分子量測定結果を示す。尚、第1図において(1)は、分子量測定に用いた標準蛋白質で分子量の高い方からホスファタゼ B (M.W. 94000)、ウシ血清アルブミン (M.W. 62000)、オボアルブミン (M.W. 42000)、カルボエンプタアンヒドラーゼ (M.W. 30000)、ソイビートリプシンインヒビター (M.W. 20100)、 α -ラクトアルブミン (M.W. 14400) である。(2)は LZ-8 の泳動結果、(3)は還元した LZ-8 の泳動結果を示す。

スペクトルの測定結果を示す。

第8図は、LZ-8 の HIV 感染細胞株 Mo11-4/HIV 増殖の抑制効果を示す。

第9図は、LZ-8 の Mo11-4/HIV の HIV 産生の抑制効果を示す。

第10図及び第11図は Mo11-4/HIV と HIV 非感染で HIV 感受性の細胞株 Mo11-4、12000 No 8 との混合培養による、巨細胞形成の抑制効果を示す模式図であつて、第10図は LZ-8 処理群、第11図は対照群である。

以上

第2図は、トリシン-SDS ポリアクリルアミド電気泳動の結果を示す。第3図は LZ-8 の等電点電気泳動による等電点測定結果を示す。(1)は、等電点マーカー(等電点レンジ 2.2~3.6)を示し、(2)は LZ-8 の泳動結果を示す。

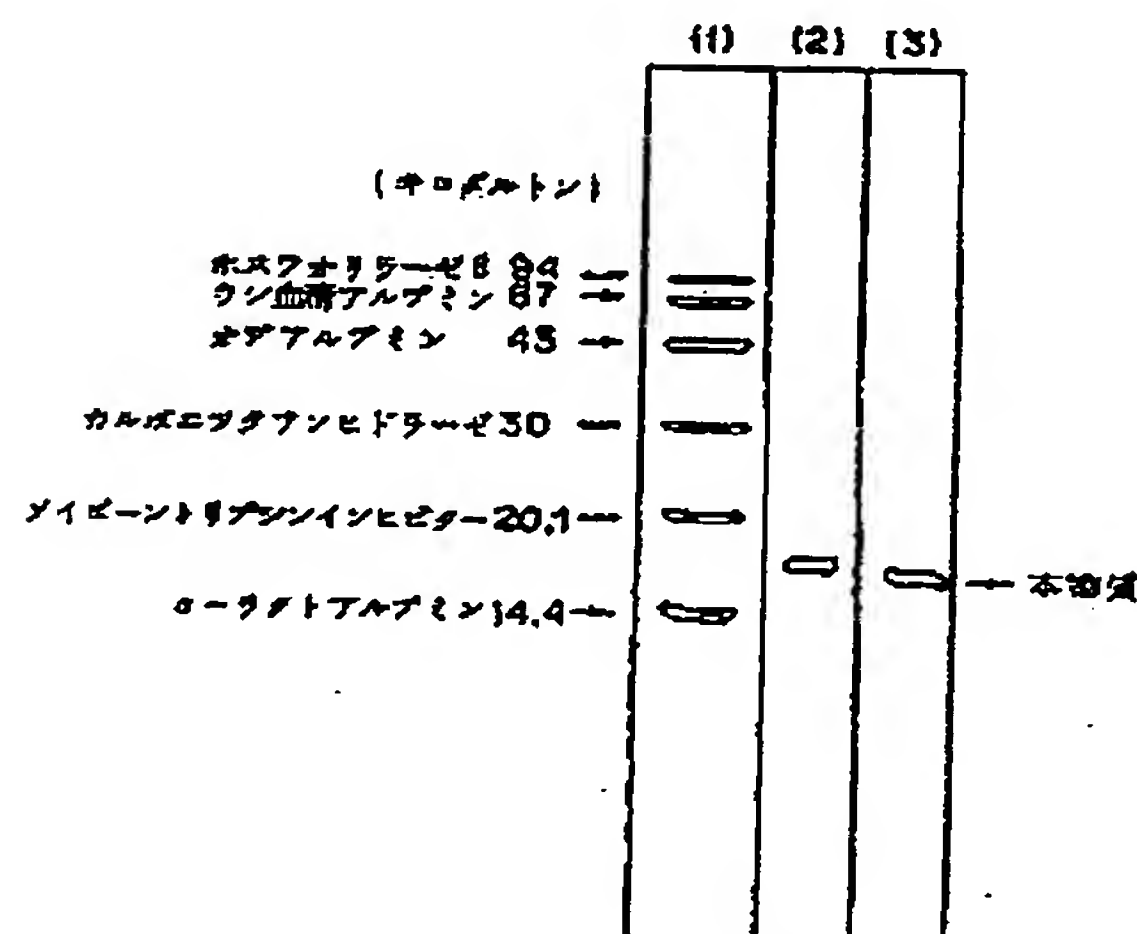
第4図は、LZ-8 をネイテツブ電気泳動にかけた後、過ヨウ素酸-シツフ染色 (PAS 染色) した結果を示す。図に示すものは、精製標品の染色位置を示す。

第5図は、LZ-8 の紫外線及び可視部吸収の測定結果を示す。

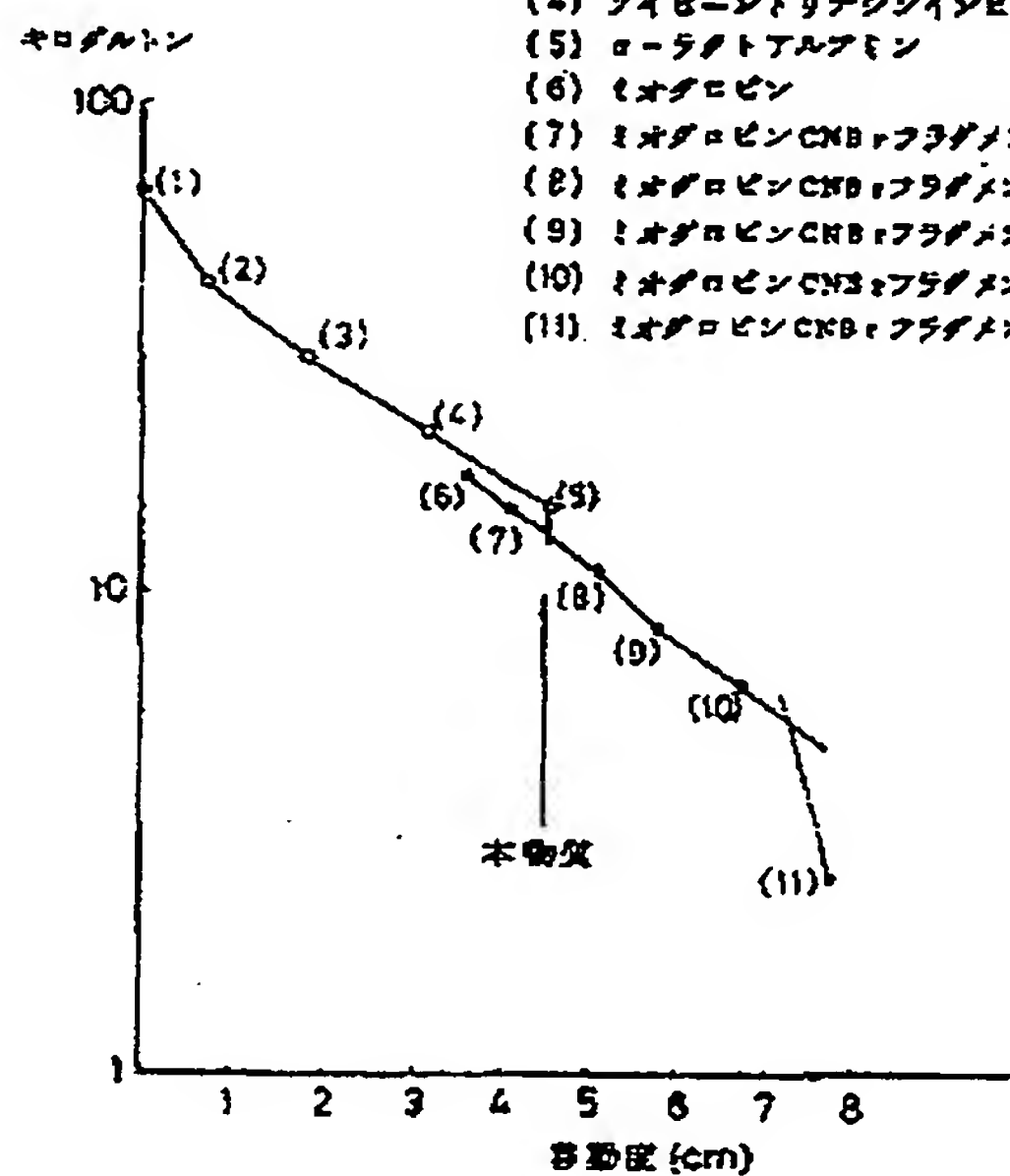
第6図は、LZ-8 の紫外線吸収の測定結果を示す。

第7図は、精製 LZ-8 のプロトン NMR 吸収

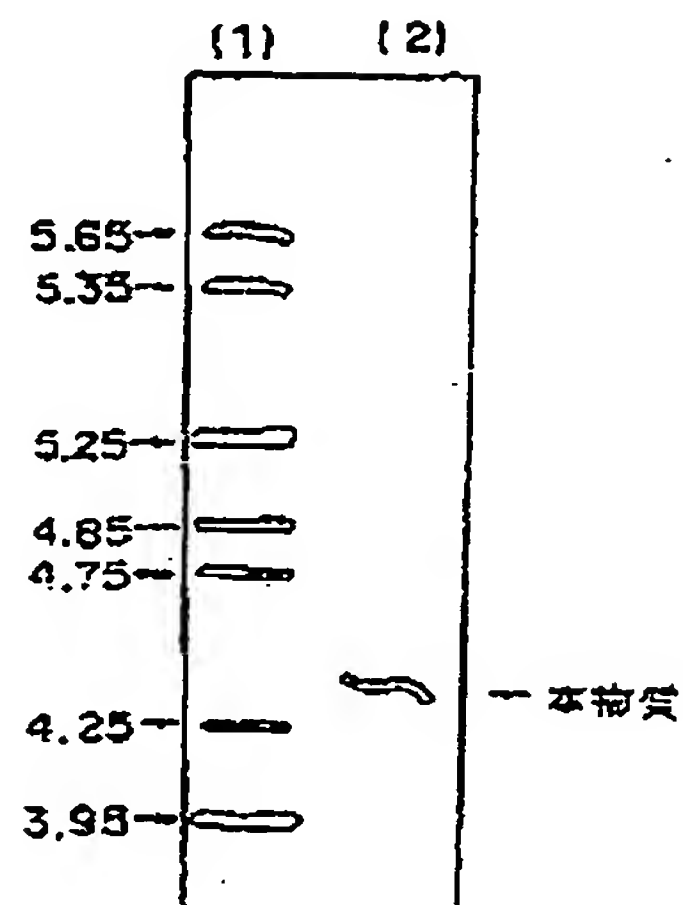
第1図



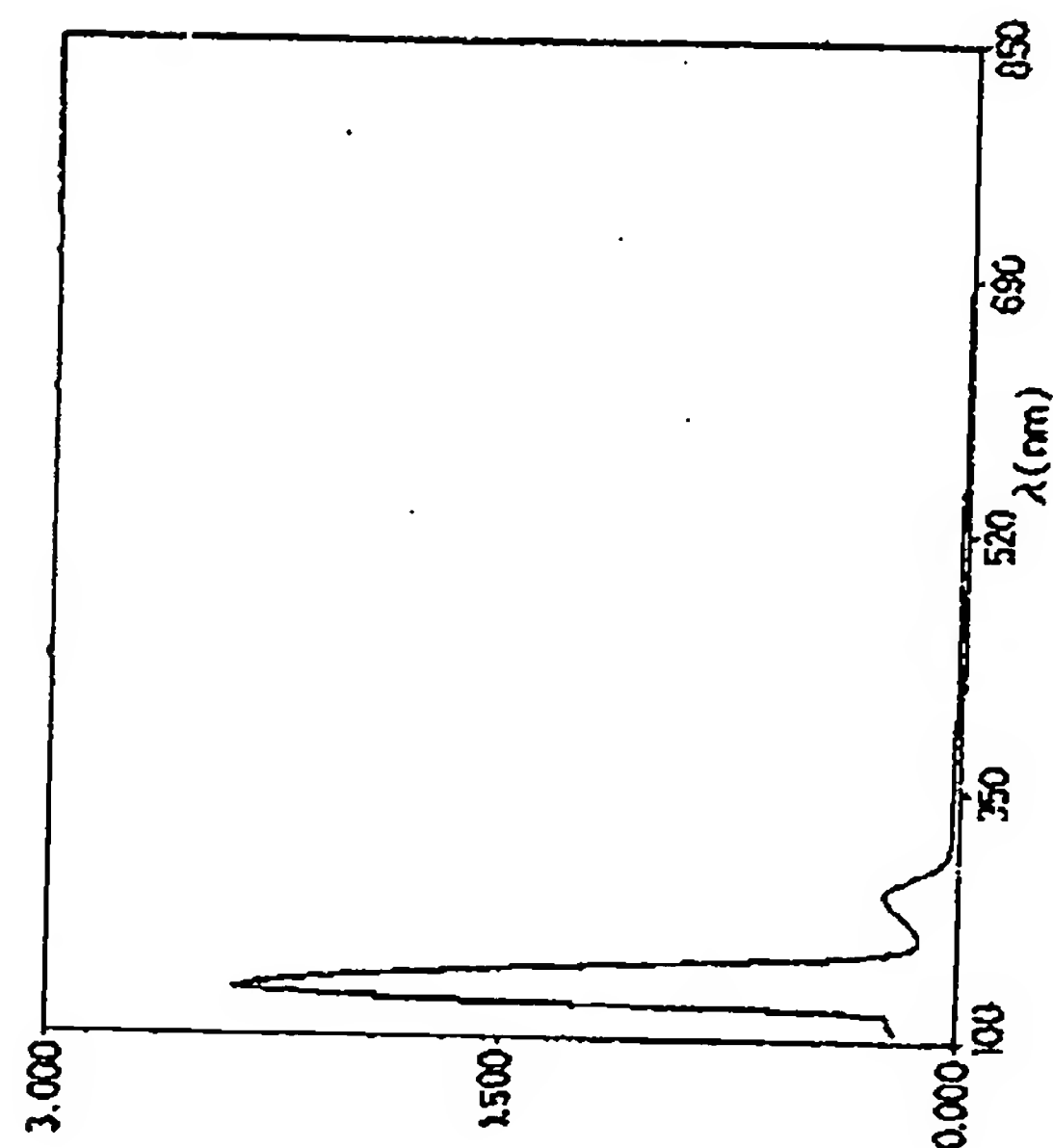
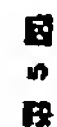
- (1) クシエンテアルブミン
- (2) オブアルブミン
- (3) カルベニフタアンヒドラーゼ
- (4) ツイバーントリプシンインヒビター
- (5) ローラットアルブミン
- (6) ミオグロビン
- (7) ミオグロビンCNDcフラグメントI (+)
- (8) ミオグロビンCNDcフラグメントI (-)
- (9) ミオグロビンCNDcフラグメントI
- (10) ミオグロビンCNDcフラグメントII
- (11) ミオグロビンCNDcフラグメントIII



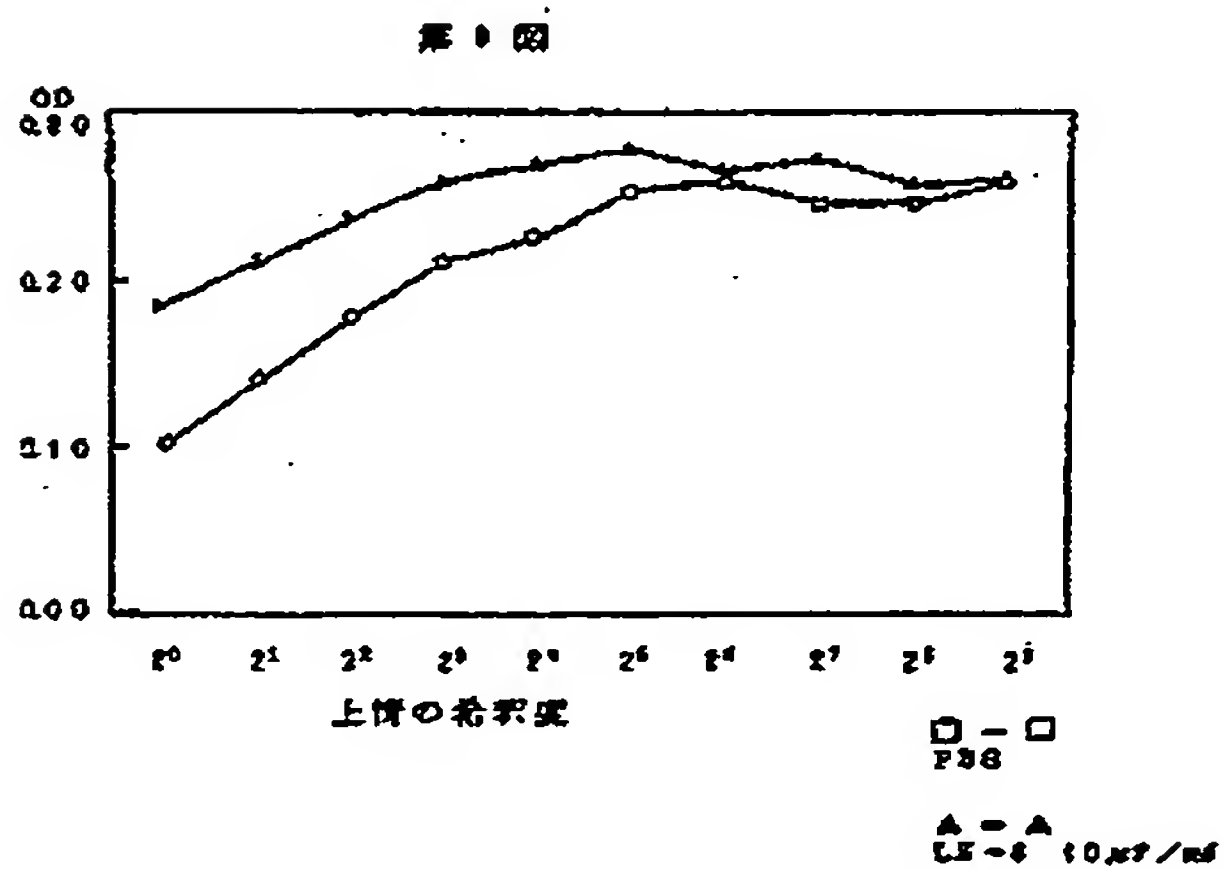
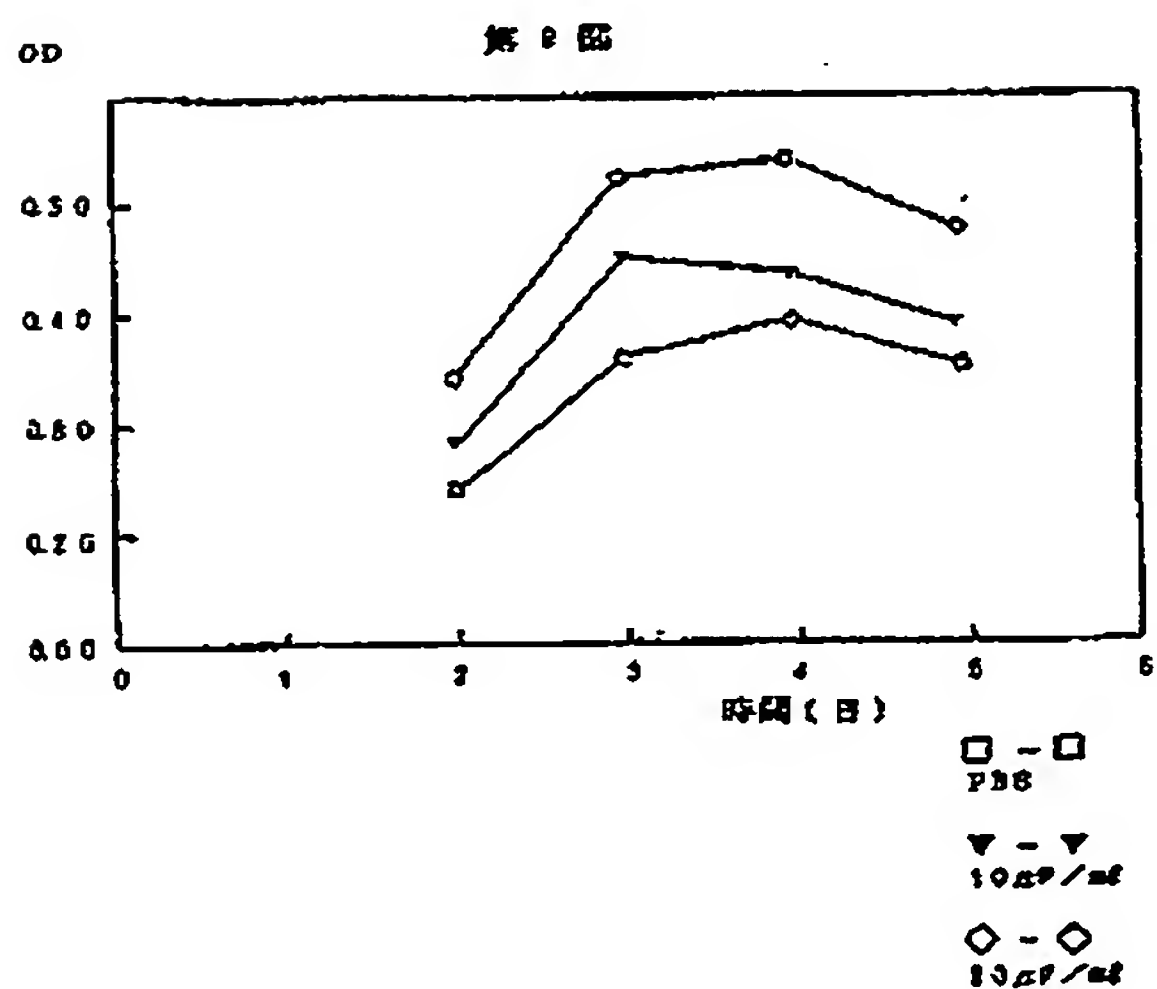
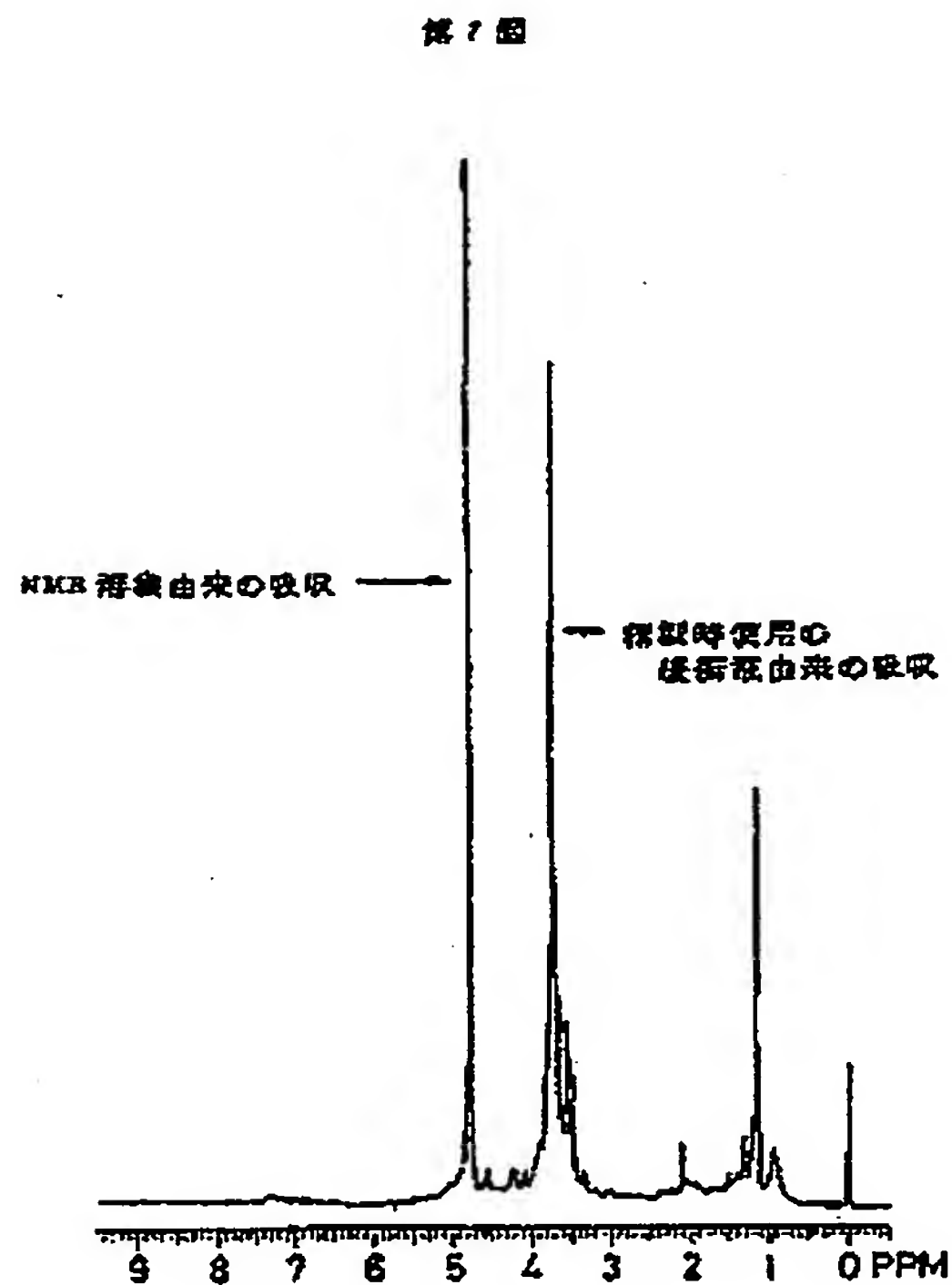
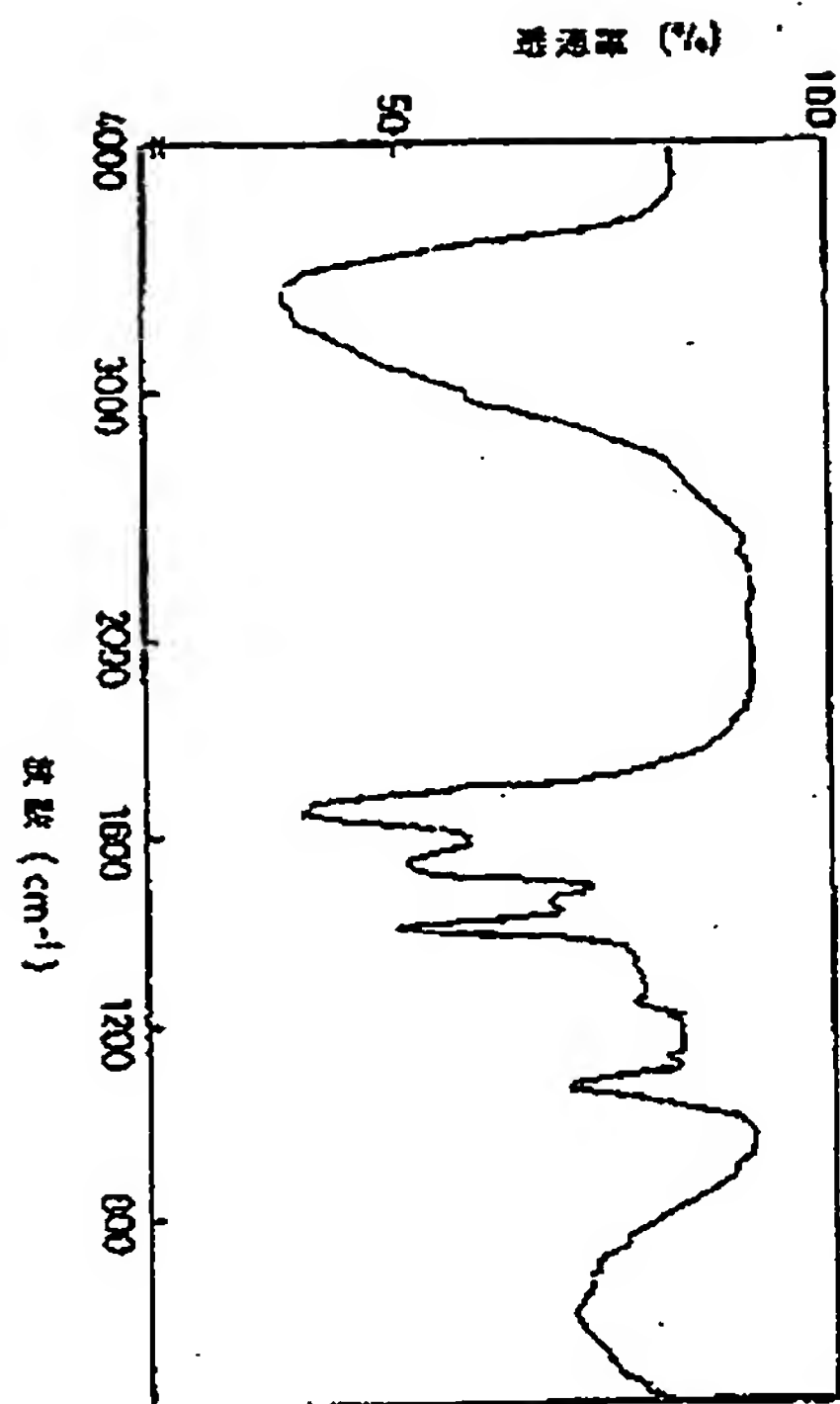
第三節



第 4 区

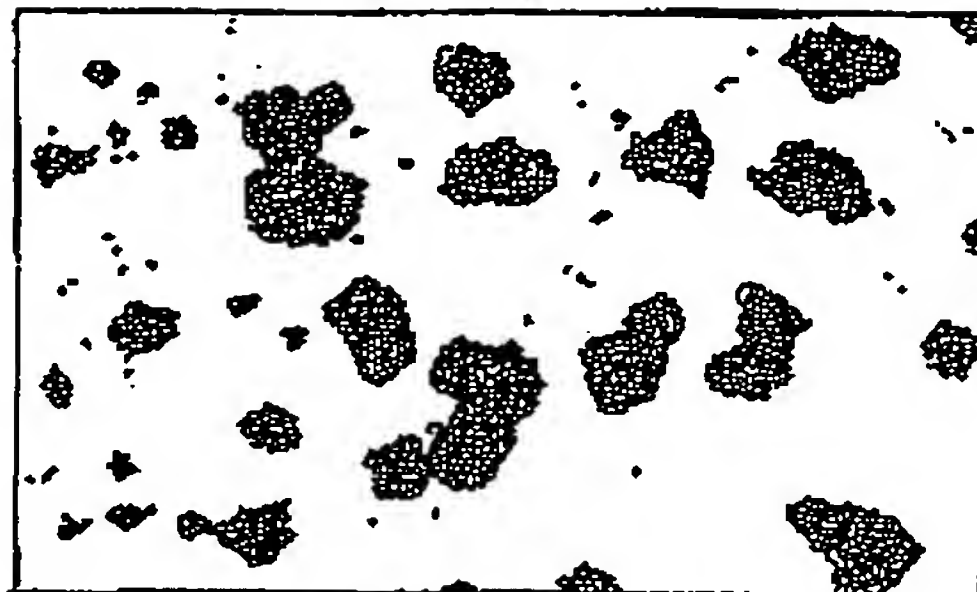


特開平2-32026 (14)

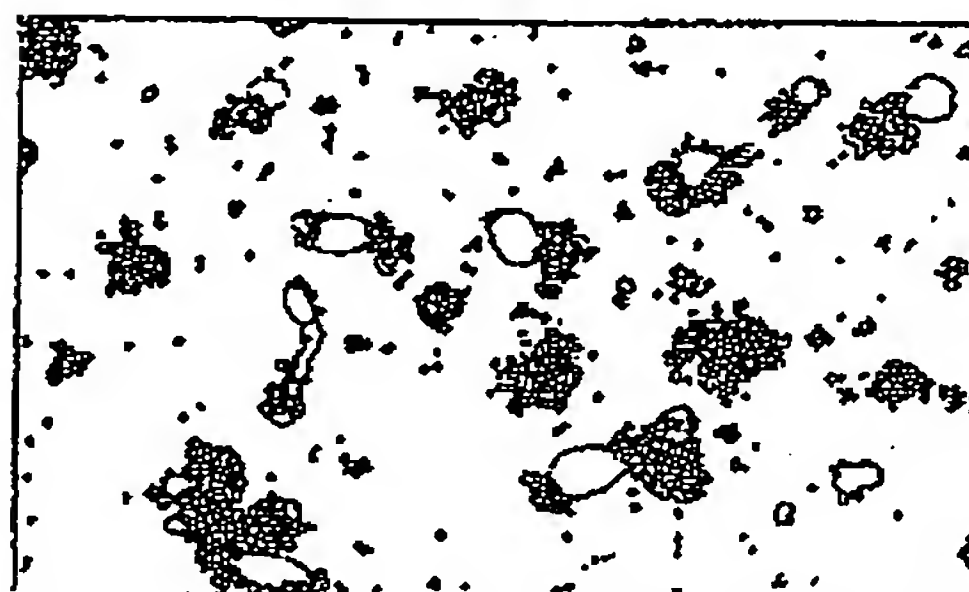


特開平2-32026 (15)

第 1 0 図



第 1 1 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.